

Analiza struktury przestrzennej białka HET-s u *Podospora anserina* i organizmów pokrewnych za pomocą wybranych narzędzi bioinformatycznych

Przemysław Maksymowicz

Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, Wydział Biologii i Hodowli zwierząt,

Biologia ze specjalnością: Techniki laboratoryjne w biologii

pmaxdragon@gmail.com

Wiele nowych odkryć w dziedzinie proteomiki oraz złożoność i koszty badań doświadczalnych, takich jak spektroskopia NMR i krystalografia, zmusiły nas w obecnych czasach do poszukiwania prostszych komputerowych rozwiązań analitycznych in silico. Zasypane informacjami molekularne bazy danych wymagają gruntownego przeglądu oraz usystematyzowania zawartych w nich materiałów, którymi są między innymi trójwymiarowy obraz biopolimerów oraz przebieg ich biochemicznych przekształceń. Proces zwijania białek jest wysoce skomplikowany, a szlak jego przekształceń w wielu przypadkach długo pozostanie nieopisany. W pracy na podstawie dostępnych struktur krystalograficznych i za pomocą gotowych algorytmów modelowania, przewidziano podobieństwo strukturalne homologów białka prionowego Het-s występującego u pewnego gatunku grzyba, jakim jest *Podospora anserina*. Organizm ten od niedawna został objęty projektem analizy całego genomu.

Wstęp

Podospora anserina (Ryc. 1) jest to strzępkowy gatunek workowca. Grzyby te są saprotrofami, dlatego naturalnie występują w odchodach zwierząt roślinożernych. Najczęściej występująca w przyrodzie forma jest dwujędrowa i zawiera obie formy koniugacyjne, może zatem produkować grzybnię z zarodników będących po procesie mejozy, twór taki nazywany jest pseudohomotalicznym. Wspomniana komórka, która zawiera dwa genetycznie różne jądra jest nazywana heterokarionem, cecha taka stosunko-

wo często występuje u innych gatunków grzybów, a heterokarionem może być zarówno komórka zarodnika lub grzybnia. Takim heterokariotycznym szczepem bardzo łatwo jest manipulować w laboratorium i rozdzielić go na haploidalny typ kojarzeniowy mat (+) i mat (-) [1]. Grzyb ten już od dawna jest używany w wielu badaniach genetycznych, a także wielokrotnie wykorzystany przy tworzeniu szczegółowych map genów. Ze względu na stosunkowo prostą budowę, tanie utrzymanie, szybkość



Ryc. 1. Makroskopowy obraz grzybní oraz zdjęcie strzępek *P. anserina* wykonane pod mikroskopem świetlnym [Institut de Génétique et Microbiologie - Université de Paris-Sud XI].

oraz efektywność wykonania różnych analiz molekularnych w wielu laboratoriach gatunek ten wykorzystywany jest do prowadzenia badań mikologicznych [2].

Szerokie możliwości badawcze oraz odkrycia współczesnej nauki umożliwiają szczegółowe przyjrzenie się strukturze molekularnej wielu elementów komórkowych, między innymi białek. Biopolimery te pełnią niezbędną rolę w większości procesów życiowych organizmu. Istotą badań jest poznanie ich funkcji oraz mechanizmu działania biologicznego. Dzięki temu możemy lepiej zrozumieć wiele procesów chorobotwórczych, spróbować odpowiedzieć na nie oraz im przeciwdziałać. Ponieważ struktura przestrzenna białka ma niebagatelny wpływ na jego funkcję biologiczną, istnieje potrzeba jej obserwacji. Celem badań było przeprowadzenie analiz struktury białka Het-s za pomocą bioinformatycznych narzędzi badawczych, takich jak programy do przewidywania struktury drugo- i trzeciorzędowej, a także porównanie jego nieopisanych homologów do modelu

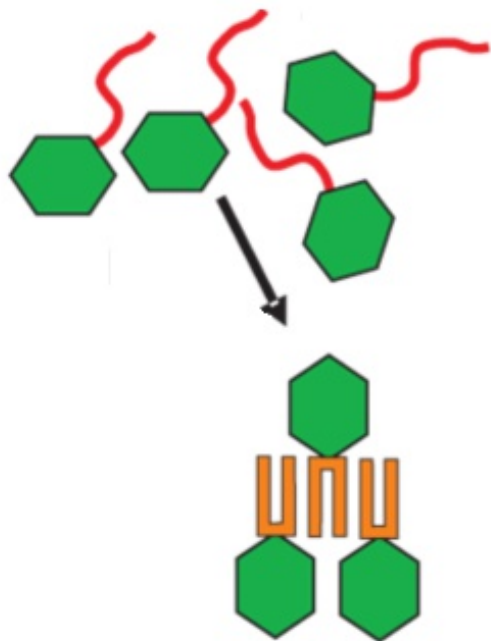
wzorcowego i ustosunkowanie się do danych opisanych w literaturze.

Mechanizm prionowy białka Het-s

Priony są to białkowe cząsteczki zakaźne będące oligomerami o masie cząsteczkowej około 27-30 kDa. Powstają one z niegroźnych białek zdrowej komórki organizmu poprzez zmianę swojej standardowej konformacji, stając się infekcyjnym białkiem prionowym. Są więc izoformami normalnego białka lub produktami zmutowanego genu, których forma patogeniczna jest odporna na działanie proteolitycznych enzymów degradujących białka. Dzięki temu prion akumuluje się w komórce, przy czym oddziałuje katalitycznie na cząsteczki prawidłowe stając się czynnikiem wyjątkowo „toksycznym”. Do tej pory większość prionów jakie zidentyfikowano u grzybów, to przede wszystkim białka występujące u drożdży.

Stosunkowo niedawno został odkryty niemendlowski gen białka Het-s u *Podospory*. Rozpuszczalna forma tego białka do tej pory nie ma określonej funkcji. Wiemy jednak, że jego forma amyloidu Het-S opisana w 1997 r. jest niezbędną do wystąpienia zjawiska niezgodności heterokarionu, dzięki któremu ogranicza fuzję okolicznych kolonii grzybów. Przedstawione na schemacie czerwone domeny (Ryc. 2) nieuporządkowanego białka występują w jego natywnej formie, ale mogą przekształcić białko w postać amyloidu stającego się później patogenicznym prionem [3].

Genetycznie kompatybilne kolonie



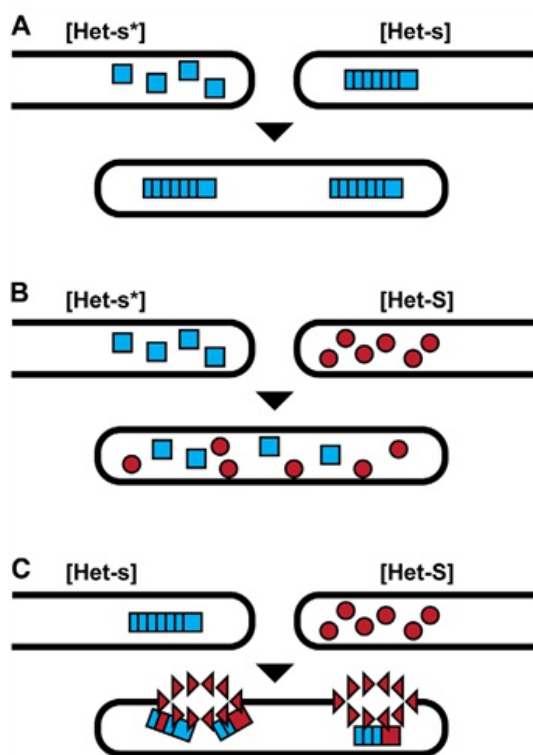
Ryc. 2. Schemat tworzenia się agregatów białek u Het-s [Wickner R.B., Edskes H.K., Shewmaker F., Nakayashiki T. (2007)].

P. anserina mogą dzielić oraz łączyć treści komórkowe, takie jak substancje odżywcze i cytoplazma. Naturalny system ochronny „niekompatybilności” białek istnieje w celu uniknięcia dowolnej wymiany materiału pomiędzy niepowiązanymi koloniami. Aby funkcjonować poprawnie, Het-s przyjmuje prionowo podobną formę [4,5]. Taka forma prionowa rozprzestrzenia się szybko w całej sieci komórkowej kompatybilnie połączonych kolonii, przekształcając nieprionową postać białka do stanu prionowego [6]. Jednak, gdy niezgodna kolonia próbuje połączyć się z kolonią zawierającą priony, następuje obumieranie komórek „najeźdźcy”, co sprawia, że tylko powiązane kolonie są w stanie osiągnąć korzyści z udostępniania zasobów.

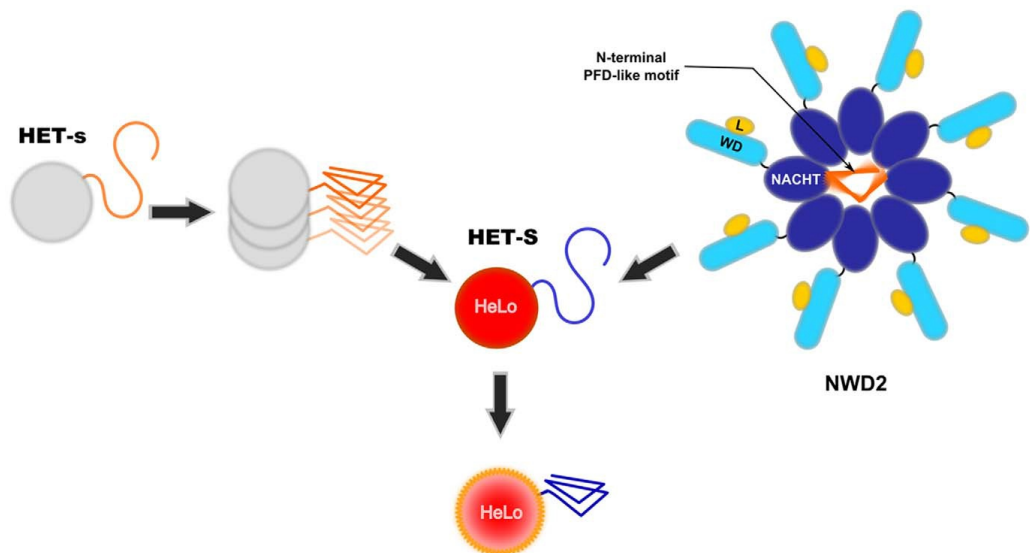
Locus białka ma dwa alternatywne

niekompatybilne allele, *het-s* i *het-S*. Kiedy szczep *het-s* łączy się ze szczepem *het-S*, następuje śmierć połączonej komórki. Reakcja śmierci komórki zachodzi jednak tylko wtedy, kiedy białko jest w konformacji prionu. Innymi słowy, zainfekowany prionem [*Het-s*] szczep jest niekompatybilny z *het-S*, podczas gdy niezainfekowany prionem szczep (oznaczony jako [*Het-s**]) jest kompatybilny z *het-S*. Dzięki fuzji komórek priony [*Het-s*] są przekazywane z jednego szczepu do innego, dodatkowo są też przekazywane w wyniku koniugacji meiotycznemu potomstwu [7].

Dwa proponowane tryby aktywacji toksyczności domeny Helo dla białka

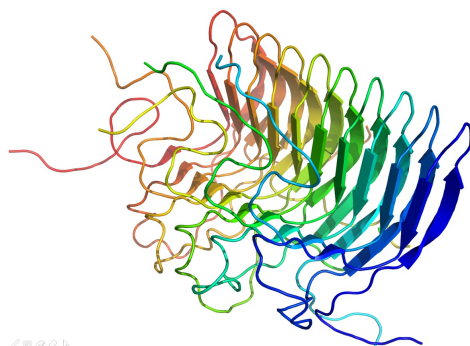


Ryc. 3. A) przekazywanie prionu, B) brak śmiertelności (kompatybilność), C) śmierć (niekompatybilność) [Fowler D.M., Kelly J.W. (2012)].

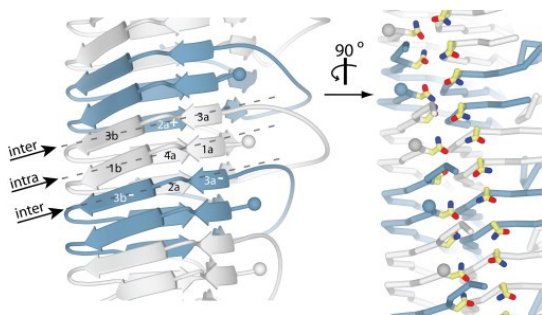


Ryc. 4. Dwa mechanizmy aktywacji toksyczności białka [Saupe S.J., Daskalov A. (2012)].

HET-s, stanowiące obecny model aktywacji toksyczności domeny HeLo HET-S przewidywane są następująco. Podczas powstawania prionów, C-końcowy HET-s prion tworzy domenę (PFD, *prion forming domain*), przyjmując b-solenoidalne zgięcie amyloidu, które służy wówczas jako szablon do zmiany konformacji odpowiedniego regionu w białku. Zmiana regionu Het-S PFD prowadzi do zmiany struktury w kolistej domenie HELO, a takie przeładowanie czyni białko toksycznym. Białko NWD2 zawiera trzy domeny: N-końcowy motyw homologiczny do Het-s PFD, centralną domenę NACHT oligomeryzacji, i C-końcową domenę WD-powtórzeń (WD). Przyjmuje się, że po związaniu ligandu (L), NWD2 ulega oligomeryzacji, która pozwala N-końcowemu regionowi białka NWD2 przyjąć Het-s podobną postać b-solenoidalnego fałdu. To N-końcowe przekształcenie prowadzi analogicznych reakcji, jak w poprzednim przypadku [8].



Ryc. 5. Model struktury agregatów domeny prionowej Het-s dokonany za pomocą spektroskopu NMR [<http://people.mbi.ucla.edu/>].



Ryc. 6. Wiązania pomiędzy poszczególnymi domenami [Greenwald1 J., Riek R. (2010)].

Materialy i metody

Gen białka Het-s znajduje się na chromosomie trzecim podospory w locus "PODANSg332":

>gi|171676735|ref|XM_001903285.1|
Podospora anserina S mat+
hypothetical protein (PODANSg332)
partial mRNA:

ATGTCAGAACCGTTCGAGATCGTTGCT
GGCGCCTGGGCGTTGCCGGCCTCTTC
AATAACTGCGTTGCCTGTTTTGAGTAC
GTCCAGCTGGGTCGCCATTTTGGGCG
CGATTACGAGAGATGCCAGCTCCGAC
TGGACATTGCGAAAGTCCGATTGAGC
CGATGGGGCGAGGCGGTCCAGATCAA
CGACGACCCACGTTTCCACTCCAGCG
CGCCAATCGATAAGTCGGTGCAATTAG
CGAAATCGATCGTCGAGGAAATCTTGC
TTCTCTTCGAGTCCGCCCAGAAGACG
TCGAAGCGATACGAGCTCGTTGCGGA
CCAGCAGGATCTGGTGGTGTTTCGAGG
ATAAGGATATGAAGCCGATCGGACGAG
CGCTGCATCGTCGGCTAAAAGATCTCG
TTTCTCGGAGACAGAAACAGACGAGC
CTAGCGAAAAAGACGGCATGGGCATT
GTACGACGGAAAAAGCCTCGAGAAAA
TAGTCGACCAGGTCGCTGGCTTTGTC
GATGAGCTGGAGAAGGCCTTCCCTATT
GAGGCCGTATGTCACAAGTTAGCGGA
GAACGAGATTGAAGAGGTGGAGGACG
AGGCGAGCCTAACAATACTCAAGGATG

CGGCGGGGGGAATCGACGCAGCTATG
TCTGATGCGGCTGCGCAGAAGATCGA
CGCGATTGTGGGAAGGAATTCCGCCA
AGGATATCAGAACAGAGAAACGTGCAA
GGGTCCAGCTCGGCAATGTTGTCACT
GCGGCAGCCCTACATGGTGAGATCCG
TATCAGCGACCAGACAACCAACTCGGT
AGAGACGGTTGTGGGGAAGGGCGAGT
CTAAGGTCCTTATTGGAAATGAGTACG
GAGGTAAAGGGTTCTGGGATAATTAA
Odpowiada za kodowanie białka
o sekwencji:

>gi|171676736|ref|XP_001903320.1|
hypothetical protein [Podospora
anserina S mat+]
MSEPFEIVAGALGVAGLFNNVCACFEY
VQLGRHFGRDYERCQLRLDIKVRSLR
WGEAVQINDDPFRFHSSAPIDKSVQLAK
SIVEEILLLFESAQKTSKRYELVADQQD
LVVFEDKDMKPIGRALHRRLKDLVSRR
QKQTSIAKKTAWALYDGKSLEKIVDQV
AGFVDELEKAFPIEAVCHKLAENEIEEV
EDEASLTILKDAAGGIDAAMSDAAAQKI
DAIVGRNSAKDIRTEKRARVQLGNVVT
AAALHGEIRISDQTTNSVETVVGKGES
KVLIGNEYGGKGFWDN

Wirtualnej transkrypcji oraz translacji
można dokonać za pomocą programu
(<http://biotools.umassmed.edu/cgi-bin/biobin/transeq>)



Ryc. 7. Locus z National Center for Biotechnology Information.



Ryc. 8. Obraz struktury drugorzędowej białka zaczerpnięty z PDB. Białko składa się z dwóch domen: jedna została nazwana kolistą, druga natomiast prionową ze względu na swoją tendencję do tworzenia agregatów.

W bioinformatyce podstawowym narzędziem do przeszukiwania molekularnych baz danych i porównywania sekwencji jest algorytm BLAST [9] (*Basic Local Alignment Search Tool*). Pozwala on naukowcom odnaleźć i zidentyfikować wprowadzone danez tymi, które przypominają sekwencję wyjściową i nie przekraczają pewnego progu podobieństwa. Różne rodzaje “blastów” są dostępne w zależności od rodzaju zapytania i danej sekwencji.

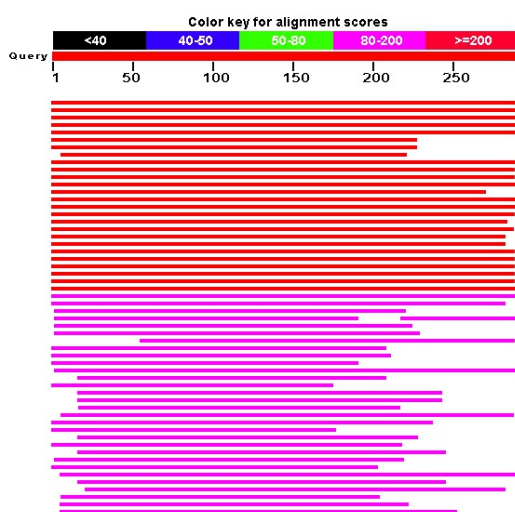
W pracy posłużyłem się narzędziem blastp (białko-białko BLAST), ponieważ właśnie w tym wypadku kwerenda białka porównuje oraz zwraca najbardziej podobne sekwencje z bazy danych białek. Jest to algorytm, który używa macierzy substytucji do znajdowania odległych pokrewieństw

z możliwością filtrowania dzielącego sekwencje białkowe na segmenty o niskim i wysokim stopniu złożoności.

Następnie wyszukałem 370 sekwencji białek, z których wiele nie ma poznanej funkcji oraz struktury, z czego wybrałem 135 wysoko punktowanych nieodbiegających znacząco długością oraz podobieństwem od pierwowzoru. MUSCLE (*Multiple Sequence Comparison by Log-Expectation*) jest progresywnym iteracyjnym przyrównaniem będącym precyzyjnym narzędziem MSA, szczególnie dobrym dla białek oraz odpowiednim dla średniej długości przyrównań. W pracy posłużyłem się tą metodą uznając ją za najbardziej właściwą dla wyszukanych danych [10].

Na piętnastu fragmentach wybranych z różnych niepowtarzających się grup białek możemy zaobserwować (Ryc. 9) regiony konserwatywne oraz niekonserwatywne (zmienne), które mogą wpływać tendencyjnie na zmiany strukturalne białka, a co za tym idzie na jego patogeniczność. Wybranymi do analizy szczepami były grzyby z kolejno wymienionych gatunków:

Podospora anserina, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium pseudograminearum*, *Nectria haematococca*, *Trichoderma atroviride*, *Arthroderma otae*, *Grosmannia clavigera*, *Dothistroma septosporum*, *Trichophyton verrucosum*, *Gibberella zeae*, *Neurospora crassa*, *Penicillium chrysogenum*, *Talaro-*



Ryc. 9 Obraz wyszukanych struktur dokonany przez BLASTP.

1	Podospora	---	MSEPF	-G	IVAGALGVAG	L---	FNNCVA	CFEYVOLGRH	FGRDYERCOL	RDLIAKVRLE	RWGEAV	---	G		
	Fusarium	---	MAEIF	-G	IVAGALSVA	L---	FNNCVD	CFGYQLSRH	FGRDPERCOL	KLDIAKIRLG	RWGEAV	---	A		
	Fusarium	---	MAEVF	-G	AVAGATISAA	L---	FNNCID	CFDYIQLSRH	FGRDPERCOL	RDLVAKCRLS	RWGAAN	---	N		
	Nectria	---	MAETF	-G	IVTGAIGLAG	L---	FQOCVE	CFEYVOLGRH	FVQDFGRCLR	KLDIAKRRLL	RWGEAV	---	N		
	Trichoderma	---	MAEVF	-G	IVTGAIGLAG	L---	FNNCVD	TFEYIQLGRH	FGRDPERCOL	KLDIAKIRLG	RWGEAV	---	G		
	Arthroderma	---	MAEPP	-G	IAAGTVGVAA	A---	FTACID	CFEYVQFGRN	FGRDFOIDL	ALNCAKLRLS	RWGEAV	---	K		
	Grosmannia	---	MAEVL	-A	VMSGAVTVAS	L---	FSSCVD	CLGVYQLGRH	FARDYHVCRL	QLDVAEMRMV	RWKEVV	---	N		
	Dothistroma	---	MEPPA	-G	LAMGVGVAA	L---	FDCGMS	AFNYVESGKS	FGKDYQKATL	KTEILQLRLS	RWGESV	---	TR		
	Trichophyton	---	MEVA	-G	LVMG	---	VAG	L---	FSCMD	VLDVSNYRE	FSTQSRQTVV	SFEANKVRLK	DWATYA	---	G
	Gibberella	---	LELIP	-K	LVLGAVGVAG	L---	GAFTDIT	LFGGLADARD	LGRDYEILKI	KFDIQITLLI	QWSDRVGLR	---	---	---	
	Neurospora	---	MEPV	-G	LAIGVIGLAG	V---	FKSCVE	LFGYFSTYRS	YGHDSYLLDA	KLHVEKAFLL	LWADRRYGV	---	---	---	
	Penicillium	---	MAEAA	-G	LAIGIVSLET	T---	FDNVID	CFEYIHLGKA	FGADSDCLL	RLDNAKLRLS	RWGEAVLSQ	---	---	---	
	Talaromyces	---	---	---	---	---	MTIC	---	---	---	---	---	---	---	---
	Magnaporthe	---	MVEPL	-G	LAIGVIGVAG	L---	FKSCID	NFDIVVRANK	FGEDFDLLCT	QALALRLRLV	LWGESLGLV	---	---	---	---
	Botryotinia	---	MSGAAEGLDG	---	LALSATSVAA	L---	FITSIE	CFDILIAKGN	FSEDPEQLLA	LFSLELAQFE	LCRDSVGSIP	---	---	---	---
71	Podospora	---	INDDPFRHSS	AF	LDKSVQ	L	AKSIVEEL	LLLFESAQKI	SKRYE	LVA	DQ	DDLVEF	EDKDM	---	KP
	Fusarium	---	INDDPFRATD	AF	NDRDSR	Q	VQAILEEI	ELLFQTIQKS	SKRYE	IDA	RQ	DDLMEF	EDQDM	---	QP
	Fusarium	---	VNDPPFRFCNN	AS	KDQTTT	L	AETLIGEI	VARFESAQKS	SLLYK	TVS	RQ	PELEIC	SEADI	---	GA
	Nectria	---	IHENPQF	---	DTETE	E	IQEILEEI	ANLFDITORS	SKRYE	RKA	PK	EELECL	SDENI	---	QP
	Trichoderma	---	VNRDERFTSA	AF	TDEAVE	A	ALGILGDI	GYCFKSAREK	SMRYT	KRA	DT	QELMVC	DKNDM	---	SP
	Arthroderma	---	IYDDPNLGRK	DA	SLAEIC	V	ANDTFYQI	LVLPSTQKI	SEKHK	MKA	RD	EDLSVE	APCDI	---	DP
	Grosmannia	---	LKDQSRSEFS	---	DNRETO	T	IKTLLTEM	EGVLTIVKRI	AERYK	RKA	SV	ADLKTC	DDKDM	---	AA
	Dothistroma	---	VDEPQSLPAG	VALASQEHK	T	VEKLLGEI	LNELEDAERI	SSRYEPEPA	NG	---	---	YDSGC	---	---	E
	Trichophyton	---	IENGVLKQSH	HVRLDEFEIL	S	AVLKLVEEI	STLFDISERS	QSRLE	---	---	---	---	---	---	YF
	Gibberella	---	TNDYDPL	---	DAHAK	EAIGETLSCT	LLLLTDGTAL	RSKYGLDVVO	DOVGASHLTS	VSSISAWKMG	---	---	---	---	E
	Neurospora	---	QRDGPHS	---	---	---	QLLVSSQSTV	GASLK	---	---	---	---	---	---	---
	Penicillium	---	VDKNTKSLKD	TR	ISEYDME	Q	AEELLGSI	TELEERVVST	DANFRAGREF	DD	OSLAVMS	AETDI	---	---	NS
	Talaromyces	---	IDGPDAKLVI	EGDSDEEKVN	K	AYHWNLEI	KRAFDSAMET	SLRFT	TTA	KP	EKLQLE	NGEQIRKGSN	---	---	S
	Magnaporthe	---	SPQGDNTYFN	IG	LDKPDIK	VVIEPSLDYL	RRLLEASV	TDRFALSNAV	DS	---	---	SPGSM	---	---	S
	Botryotinia	---	EPNTGRRLKY	DKNIDRPDIK	PGVERILNMM	---	KSLEEGSKI	NKKYK	ETS	PS	SOL	---	TSQSM	---	G
141	Podospora	---	IGRALHRLK	DLVSRROKOT	SLAKKTAWAL	YDGKSLEKIV	DQVAGFVDEL	EKAFF	---	---	---	AVC	---	---	HLKA
	Fusarium	---	VVRGLHGLRG	VIARQORRT	ALLKKTAWAL	YDGKNFDRLV	EQITGFVDDL	EKVFF	---	---	---	---	---	---	RLKV
	Fusarium	---	VPQLHTHFR	TLTMQRQNRV	GLTKKAYWAI	YDKNMGRLI	DDIPDFDNDL	EKVFF	---	---	---	---	---	---	SLRV
	Nectria	---	VFRGLHARWA	KISPPKORDV	SLMRKTTWAL	YDAKYFEKLI	GEVTFGVDDL	EKVFF	---	---	---	---	---	---	CHLV
	Trichoderma	---	LFQRLHNRCA	DIARRRQKSV	GILKKSADWL	YDGKSLDNIT	NOILSWDEL	EKLFP	---	---	---	---	---	---	OKVV
	Arthroderma	---	IVTALDNMR	ALVIRROKGS	SVLKTASWAL	YHSEFKRLI	EDIVSLISNL	EKIFP	---	---	---	---	---	---	OLIA
	Grosmannia	---	VPKVVHQRIR	RVIGRRQESN	LFVQKAAWAL	YDREQFKMI	AEVLELDEL	EKVLQ	---	---	---	---	---	---	RORA
	Dothistroma	---	SIESLTVIRI	ELALTROKKV	SFGLKAKWAL	HHKGLKNLI	DSLDGNVSKL	VELFP	---	---	---	---	---	---	QOLA
	Trichophyton	---	QVVVSSAEK	GKASKNSSPK	SIRGGISWAL	RKGKSFQSV	TMFGKFVDEL	HNLLP	---	---	---	---	---	---	ALLI
	Gibberella	---	VFKNOYDDFK	KRMAGQ-NEM	PFSSALWAV	RDKTKFQVLV	ADLADLTITL	DLLEP	---	---	---	---	---	---	QTLV
	Neurospora	---	KEKNYDYNAMO	LRIHHRKAT	STSDKLWMI	VDKDKFNTLI	AELSHFSTKL	DALLPGDSS	---	---	---	---	---	---	RTVS
	Penicillium	---	VGLSLHEKMO	KIAKORONNI	SIRQAKWAL	FORAHFQDMV	ANIASDYKEL	QELFP	---	---	---	---	---	---	EVLV
	Talaromyces	---	ALQKLHEKMS	NISDERVKPR	K-RDRVSWAL	YRKGNENLV	ENISMLYSKL	VELFP	---	---	---	---	---	---	KRIC
	Magnaporthe	---	LERDRDFAFR	RRMHANQKON	SVWKTIRWAV	HDAAAFKAIV	DOIKQLVDGL	ESITGTMENL	---	---	---	---	---	---	RAAL
	Botryotinia	---	LEKTSFEERK	FRIRKHQKOT	SANKVTPWAV	HDARKFESLI	ERLKRYFDGL	ESITV	---	---	---	---	---	---	HSIL
211	Podospora	---	ENEIEEEV	---	DEASLTIL	KDAA	---	GG	IDAAMS	DAAA	OKIDAIVGRN	SAKDITRTEK	ARVQIGNVVI	---	---
	Fusarium	---	ELEIEEVD	---	DEPSLMAL	QDAA	---	AG	NDSVLS	EAVT	KKIEGGIAGR	TKIDIKSEEM	ARVRVGNWS	---	---
	Fusarium	---	EMDIEEVN	---	DQGLKMI	QDAA	---	KD	LDPLADTE	---	SKLQETGON	TAGYISG	---	---	GRINIGHTFV
	Nectria	---	QIEIEDIS	---	DEESLTVL	QETA	---	NG	TDCLLAAAVK	---	EKINTISVRN	YVREIQGEEN	AKVRIGNDWS	---	---
	Trichoderma	---	EIEIEEDS	---	DEPSLKAL	RDAA	---	RD	TDPLVEALE	---	RKVALLEGSN	STGNVLLEDA	ARIHVGNVFS	---	---
	Arthroderma	---	DEEAAQVH	---	DKSSLKLL	ETAA	---	RD	VDPLLEATK	---	---	YSNEVV	---	---	GKAHTGDAFH
	Grosmannia	---	EQATSEVG	---	DVASLQVL	QEAA	---	RG	TDPLLLDVVC	---	RKGEALGSHN	FARDIKAADQ	ADVQVGDQFS	---	---
	Dothistroma	---	QEQATLAEI	---	AQDEKAVLAL	KEAS	---	QE	LDPLDLSAL	---	YATISGS	G-TVFSTSDT	ASIFAGNYVA	---	---
	Trichophyton	---	ETRKNTLIQI	---	QKRVEEWLDA	PETE	---	QD	YERHLSACL	---	---	---	---	---	---
	Gibberella	---	DDVVRIS	---	GLSNLKM	LEAS	---	QD	THRLISQSTE	---	---	---	---	---	---
	Neurospora	---	RNEVLSVY	---	KENAKLIP	QDAA	---	DG	---	---	---	---	---	---	---
	Penicillium	---	DKETLELS	---	ESLLVL	RDAT	---	KE	QDNALASALG	---	AVLKPVAEK	---	---	---	---
	Talaromyces	---	QGEIREI	---	EPESLDLL	GNAT	---	GE	EDEIFQAV	---	KVELAKGFN	LEINIAVIDH	ENGHGNNIA	---	---
	Magnaporthe	---	VGEISVE	---	DTSLRLI	QMAS	---	GS	SND	---	RDAST	FLISDVASH	---	---	---
	Botryotinia	---	KQEIDSTS	---	DVKSLRL	RDATSSHKS	---	---	---	---	---	---	---	---	---
281	Podospora	---	AAALHGEIR	---	ISDOTINS	VEIVVGKES	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	Fusarium	---	ETTMARGTG	---	IADRTANH	ADSVEAK	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	Fusarium	---	NDSFVQSKG	---	PCDNTFNH	VDEINLDETA	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	Nectria	---	TSALSTATG	---	LDRTNRNE	AGSVTAKGSS	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	Trichoderma	---	ERVLYGTIS	---	LDQTRNT	VGVSANSDS	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	Arthroderma	---	GDWHGNANG	---	ASHI	YDGEVGENG	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	Grosmannia	---	QIVLMGGTIG	---	GPAFHGANNT	VHGLDAGSA	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	Dothistroma	---	HGYTGPISN	---	---	FENVQTSRQ	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	Trichophyton	---	SDYFPRETA	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	Gibberella	---	RKIHDRRET	---	VTGAHRKI	LNALYPPRD	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	Neurospora	---	RCMDRRKDS	---	VSPAHVKT	LQWALPKACK	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	Penicillium	---	NNVHGGNVG	---	VMSAHRSN	INOTFG	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	Talaromyces	---	AGEASARA	---	AGGNAVAH	EGSNIGYKKG	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	Magnaporthe	---	SSFSRLVGS	---	GSLYHTTPLY	PRAQLQASD	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	Botryotinia	---	KNALSKPSQV	---	IDSLSAPQ	PPGAWILIK	---	---	---	---	---	---	---	---	---

Ryc. 10. Przrównanie MUSCLE dokonane za pomocą programu SeaView.

myces stipitatus, *Magnaporthe oryzae*, *Botryotinia fuckeliana*.

ProtParam jest narzędziem, które pozwala na obliczenie różnych parametrów fizykochemicznych dla danego białka przechowywanych w Swiss-Prot, Trembl lub bezpośrednio z wprowadzanych przez użytkownika sekwencji. Wyliczone parametry to masa cząsteczkowa, teoretyczny punkt izoelektryczny, skład aminokwasowy, skład atomów, współczynnik ekstynkcji, szacowany okres półtrwania, indeks niestabilności, indeks alifatyczności i średnia wielkość hydropatyczności [11]. ProtScale pozwala obliczyć i zaprezentować profil wyprodukowany przez każdą skalę aminokwasową dla wybranego białka. Skala aminokwasowa jest zdefiniowana przez wartość numeryczną przeznaczoną dla każdego typu aminokwasu. Najczęściej stosowane są skale hydrofobowości lub skale hydrofilowości oraz parametry wagi drugorzędowej struktury konformacyjnej, lecz istnieje wiele innych rodzajów skal, które są oparte na różnych właściwościach chemicznych i fizycznych aminokwasów. Program ten zawiera 57 predefiniowanych skal zawartych w literaturze [12].

Do przewidywania drugorzędowej struktury białek i sekwencji RNA wykorzystywany jest zestaw technik bioinformatycznych dokonujący analizy w oparciu jedynie o znajomość podstawowej struktury polimeru: aminokwasów lub sekwencji nukleotydów. W przypadku białek, przewidywanie składa się z przypisania regionowi sekwencji aminokwasów o określonej strukturze: alfa helisy, beta harmonijki lub

spinki. Sukces przewidywania jest określony przez porównanie z wynikami DSSP algorytmu stosowanego przy strukturze krystalicznej białka. Najlepsze metody przewidywania struktury drugorzędowej białek pozwalają na uzyskanie około 80% dokładności [13], a dodatkowo metody te można łączyć, co daje lepsze rezultaty. Należą do nich między innymi: metoda Garnier-Gibrat-Robson (GOR), metoda homologów Levina, metoda podwójnego przewidywania (DPM), oraz metoda PHD i inne.

Praktyczna rola przewidywania dokładnej struktury białek jest obecnie ważniejsza niż kiedykolwiek. Ogromne ilości danych sekwencji białkowych są składowane w bibliotekach między innymi dzięki nowoczesnym metodom sekwencjonowania. Pomimo wysiłków całej społeczności w doskonaleniu dziedziny genomiki strukturalnej, doświadczalne ustalenie struktury białka jest czasochłonne i stosunkowo drogie, dlatego krystalografia rentgenowska oraz spektroskopia NMR nie nadążają z analizą odkrytych białek. Przewidywanie ich struktury jest natomiast niezwykle trudne. Metoda przewidywania struktury białek poza znalezieniem dla białka profilu energetycznego musi zbadać całą przestrzeń dla możliwych struktur białkowych, a jest ona olbrzymia. Problemy te mogą zostać jednak częściowo usunięte poprzez analizy porównawcze. Problem przewidywania rozmieszczenia białka w przestrzeni znika przy założeniu, że analizowane białko przyjmuje strukturę bliską ustalonemu doświadczalnie homologowi [14].

ESyPred3D to zautomatyzowany pro-

gram do homologicznego modelowania. Metoda wykorzystuje sieci neuronowe. Trasowania otrzymywane są przez połączenie, wagi i przesiewania wyników kilku różnych programów. Ostateczna struktura trójwymiarowa jest zbudowana przy użyciu pakietów modelowania programu modeller [15]. Zwykle wykonywane są cztery etapy modelowania homologii: wyszukanie podobnej sekwencji o znanej konstrukcji, kwerenda porównania i sekwencji szablonu, zbudowanie modelu 3D przy użyciu ostatniego przyrównania oraz końcowa ocena modelu 3D [16].

RaptorX to serwer do przewidywania struktury białka opracowany przez grupę Xu [17]. Doskonali się w przewidywaniu struktur 3D sekwencji białkowych bez bliskich homologów w Protein Data Bank (PDB). Biorąc pod uwagę sekwencję wyjściową, przewiduje jej drugorzędową trzeciorzędową strukturę oraz regiony nieuporządkowane. Następnie program przypisuje wyniki do dalszego wskazania jakości przewidywanego modelu 3D: P-value względnej jakości globalnej, GDT (globalny test odległości) i uGDT (znormalizowany GDT) dla absolutnej jakości globalnej, a średni pierwiastek odchylenia kwadratowego dla bezwzględnej jakości lokalnej każdego elementu w modelu [18].

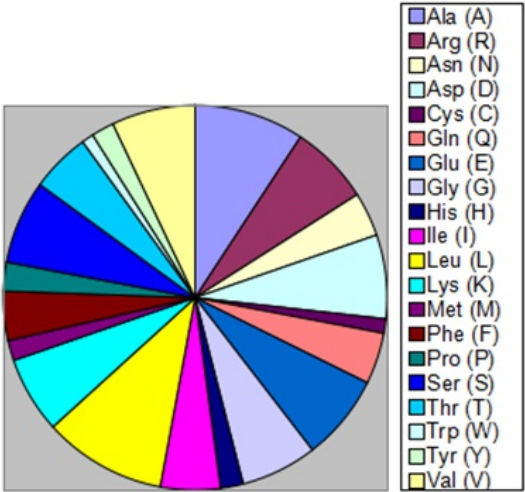
Wyniki

Właściwości fizykochemiczne

Analizy składu aminokwasów, pierwiastków oraz wybranych właściwości fizykochemicznych dokonano za pomocą programu protpram. Wszys-

tkie dane użyte do stworzenia poniższego wykresu zostały podane w tabelach.

Index alifatyczności: 94.19
Grand average of hydropathicity (GRAVY): -0.289



Ryc. 11. Średni skład procentowy aminokwasów w białkach.

Tab. 1. Pokazuje wagę molekularną, teoretyczny punkt izoelektryczny, skład poszczególnych aminokwasów analizowanych białek. Tłustym drukiem podkreślono największe wartości.

	Liczba aminokwasów	Masa molekularna	pI
Podospora	289	31960.3	5.56
Fusarium o.	270	30442.4	5.1
Fusarium p.	287	32057	5.12
Nectria	278	31419.2	5.05
Trichoderma	290	32369.5	5.35
Arthroderma	276	30609.6	6.08
Grosmannia	284	31498.9	6.62
Dothistroma	283	30858.5	5.36
Trichophyton	233	26365.8	5.7
Gibberella	277	31590.5	9.32
Neurospora	236	26765.4	7.73
Penicillium	257	28458.3	5.27
Talaromyces	245	27246.9	6.98
Magnaporthe	280	31025.5	9.54
Botryotinia	304	34221.1	8.86

Tab. 2. Skład atomów analizowanych białek. Tłustym drukiem podkreślono największe wartości.

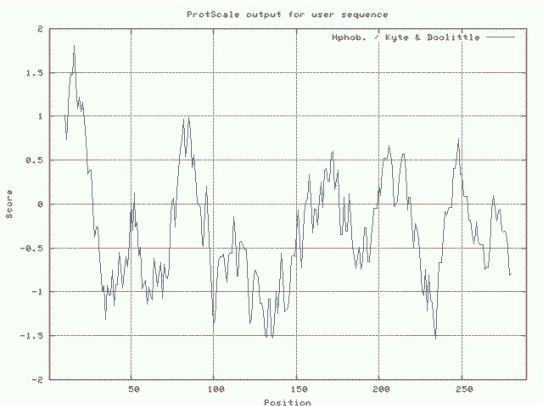
Atom:	C	H	N	O	s
Podospora	1406	2268	400	435	7
Fusarium o.	1326	2136	388	415	9
Fusarium p.	1409	2203	393	441	11
Nectria	1376	2180	390	436	8
Trichoderma	1412	2267	407	444	10
Arthroderma	1366	2137	377	409	7
Grosmannia	1362	2221	407	422	14
Dothistroma	1362	2144	376	432	5
Trichophyton	1170	1848	320	359	7
Gibberella	1411	2290	402	405	7
Neurospora	1192	1881	333	354	7
Penicillium	1246	2018	352	390	9
Talaromyces	1195	1920	346	368	7
Magnaporthe	1364	2206	400	408	9
Botryotinia	1528	2446	420	458	6

Szacowany okres półtrwania:
>20 godzin (drożdże, *in vivo*).
>10 godzin (*Escherichia coli*, *in vivo*).
Używając skali hydrofobowości Kyte & Doolittle (proponowanym progiem jest 1.6), poszczególne wartości dla 20 aminokwasów są następujące:
Ala: 1.800; Arg: -4.500; Asn: -3.500;
Asp: -3.500; Cys: 2.500; Gln: -3.500;
Glu: -3.500; Gly: -0.400; His: -3.200;
Ile: 4.500; Leu: 3.800; Lys: -3.900;
Met: 1.900; Phe: 2.800; Pro: -1.600;
Ser: -0.800; Thr: -0.700; Trp: -0.900;
Tyr: -1.300; Val: 4.200.

Dla większości białek uzyskano porównywalne wyniki, które wskazują na zwiększoną hydrofobowość regionu znajdującego się w obrębie około trzydziestu pierwszych aminokwasów, co wskazuje na jego transbłonowość. Analiza za pomocą narzędzia NPSA została przeprowadzona przy pomocy maksymalnej ilości algorytmów do

przewidywania struktury: SOPM (Geourjon and Deleage, 1994), SOPMA (Geourjon and Deleage, 1995) HNN (Guermeur, 1997), MLRC on GOR4, SIMPA96 and SOPMA (Guermeur et al., 1998) DPM (Deleage and Roux, 1987), DSC (King and Stenberg, 1996) GOR I (Garnier et al., 1978), GOR III (Gibrat et al., 1987) GOR IV (Garnier et al., 1996), PHD (Rost et al., 1994) PREDATOR (Argos et al., 1996), SIMPA96 (Levin et al., 1996)

Z przeprowadzanych analiz, które na pewno nie odzwierciedlają w pełni swoją dokładnością badanych struktur, dla większości przypadków możemy jednak zauważyć stosunkowo wysokie podobieństwo oraz na tej podstawie wyodrębnić dwie domeny białkowe. Niebieskim kolorem określono regiony, w których występuje struktura alfa-helisy natomiast na czerwono regiony, w których znajdują się struktury beta harmonijki.



Ryc. 12. Profil hydrofobowy białka Het-s dla gatunku *Podospora anserina*.

Tab. 3. Liczba aminokwasów występujących w danym białku.

	Podospora	Fusarium o.	Fusarium p.	Nectria	Trichoderma	Arthroderma	Grosmannia	Dothistroma	Trichophyton	Gibberella	Neurospora	Penicillium	Talaromyces	Magnaporthe	Botryotinia
Ala (A)	32	28	25	22	25	30	30	32	14	20	20	28	26	24	21
Arg (R)	18	25	15	19	22	13	23	11	14	26	15	13	15	26	20
Asn (N)	9	9	18	12	14	11	6	9	7	4	6	14	15	9	10
Asp (D)	21	24	25	16	21	23	20	15	11	27	18	18	12	20	17
Cys (C)	4	3	6	6	5	4	6	2	3	2	3	2	2	2	3
Gln (Q)	13	13	14	14	11	9	17	16	9	11	9	12	7	13	10
Glu (E)	25	23	15	30	23	16	21	24	22	9	14	21	24	9	20
Gly (G)	20	17	20	18	21	20	20	23	13	15	13	14	19	16	12
His (H)	5	2	5	5	3	8	6	7	4	5	7	5	5	4	6
Ile (I)	18	16	19	17	15	14	6	9	10	17	7	10	13	12	24
Leu (L)	25	23	22	24	26	25	27	30	22	41	31	32	23	34	35
Lys (K)	22	14	16	15	16	22	17	19	15	16	18	18	21	9	21
Met (M)	3	6	5	2	5	3	8	3	4	5	4	7	5	7	3
Phe (F)	10	12	16	11	9	14	9	12	9	9	8	10	9	12	17
Pro (P)	5	5	6	6	5	7	3	8	7	7	6	4	6	11	11
Ser (S)	17	11	14	15	17	15	15	23	23	16	21	17	13	31	39
Thr (T)	9	14	20	18	16	12	13	14	15	19	9	9	11	12	15
Trp (W)	3	3	3	4	4	4	2	2	6	6	5	2	3	3	3
Tyr (Y)	5	3	7	6	7	7	4	8	5	5	8	2	4	4	5
Val (V)	25	19	16	18	25	19	31	16	20	17	14	19	12	22	12

Tab. 4. Procentowy skład aminokwasów występujących w danym białku. Skład każdego białka wykazuje duże podobieństwo do białka Het-s gatunku *Podospora anserina*.

	Podospora	Fusarium o.	Fusarium p.	Nectria	Trichoderma	Arthroderma	Grosmannia	Dothistroma	Trichophyton	Gibberella	Neurospora	Penicillium	Talaromyces	Magnaporthe	Botryotinia
Ala (A)	11.10%	10.40%	8.70%	7.90%	8.60%	10.90%	10.60%	11.30%	6.00%	7.20%	8.50%	10.90%	10.60%	8.60%	6.90%
Arg (R)	6.20%	9.30%	5.20%	6.80%	7.60%	4.70%	8.10%	3.90%	6.00%	9.40%	6.40%	5.10%	6.10%	9.30%	6.60%
Asn (N)	3.10%	3.30%	6.30%	4.30%	4.80%	4.00%	2.10%	3.20%	3.00%	1.40%	2.50%	5.40%	6.10%	3.20%	3.30%
Asp (D)	7.30%	8.90%	8.70%	5.80%	7.20%	8.30%	7.00%	5.30%	4.70%	9.70%	7.60%	7.00%	4.90%	7.10%	5.60%
Cys (C)	1.40%	1.10%	2.10%	2.20%	1.70%	1.40%	2.10%	0.70%	1.30%	0.70%	1.30%	0.80%	0.80%	0.70%	1.00%
Gln (Q)	4.50%	4.80%	4.90%	5.00%	3.80%	3.30%	6.00%	5.70%	3.90%	4.00%	3.80%	4.70%	2.90%	4.60%	3.30%
Glu (E)	8.70%	8.50%	5.20%	10.80%	7.90%	5.80%	7.40%	8.50%	9.40%	3.20%	5.90%	8.20%	9.80%	3.20%	6.60%
Gly (G)	6.90%	6.30%	7.00%	6.50%	7.20%	7.20%	7.00%	8.10%	5.60%	5.40%	5.50%	5.40%	7.80%	5.70%	3.90%
His (H)	1.70%	0.70%	1.70%	1.80%	1.00%	2.90%	2.10%	2.50%	1.70%	1.80%	3.00%	1.90%	2.00%	1.40%	2.00%
Ile (I)	6.20%	5.90%	6.60%	6.10%	5.20%	5.10%	2.10%	3.20%	4.30%	6.10%	3.00%	3.90%	5.30%	4.30%	7.90%
Leu (L)	8.70%	8.50%	7.70%	8.60%	9.00%	9.10%	9.50%	10.60%	9.40%	14.80%	13.10%	12.50%	9.40%	12.10%	11.50%
Lys (K)	7.60%	5.20%	5.60%	5.40%	5.50%	8.00%	6.00%	6.70%	6.40%	5.80%	7.60%	7.00%	8.60%	3.20%	6.90%
Met (M)	1.00%	2.20%	1.70%	0.70%	1.70%	1.10%	2.80%	1.10%	1.70%	1.80%	1.70%	2.70%	2.00%	2.50%	1.00%
Phe (F)	3.50%	4.40%	5.60%	4.00%	3.10%	5.10%	3.20%	4.20%	3.90%	3.20%	3.40%	3.90%	3.70%	4.30%	5.60%
Pro (P)	1.70%	1.90%	2.10%	2.20%	1.70%	2.50%	1.10%	2.80%	3.00%	2.50%	2.50%	1.60%	2.40%	3.90%	3.60%
Ser (S)	5.90%	4.10%	4.90%	5.40%	5.90%	5.40%	5.30%	8.10%	9.90%	5.80%	8.90%	6.60%	5.30%	11.10%	12.80%
Thr (T)	3.10%	5.20%	7.00%	6.50%	5.50%	4.30%	4.60%	4.90%	6.40%	6.90%	3.80%	3.50%	4.50%	4.30%	4.90%
Trp (W)	1.00%	1.10%	1.00%	1.40%	1.40%	1.40%	0.70%	0.70%	2.60%	2.20%	2.10%	0.80%	1.20%	1.10%	1.00%
Tyr (Y)	1.70%	1.10%	2.40%	2.20%	2.40%	2.50%	1.40%	2.80%	2.10%	1.80%	3.40%	0.80%	1.60%	1.40%	1.60%
Val (V)	8.70%	7.00%	5.60%	6.50%	8.60%	6.90%	10.90%	5.70%	8.60%	6.10%	5.90%	7.40%	4.90%	7.90%	3.90%

unknown

Structure no. 1

Segments included: 1

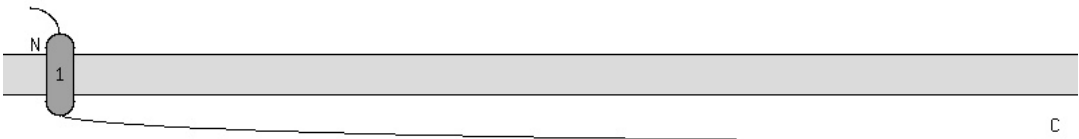
Segment Putative

Segment Certain

CYTOPLASM

L1 = 4

KR = 0



L1 = 264

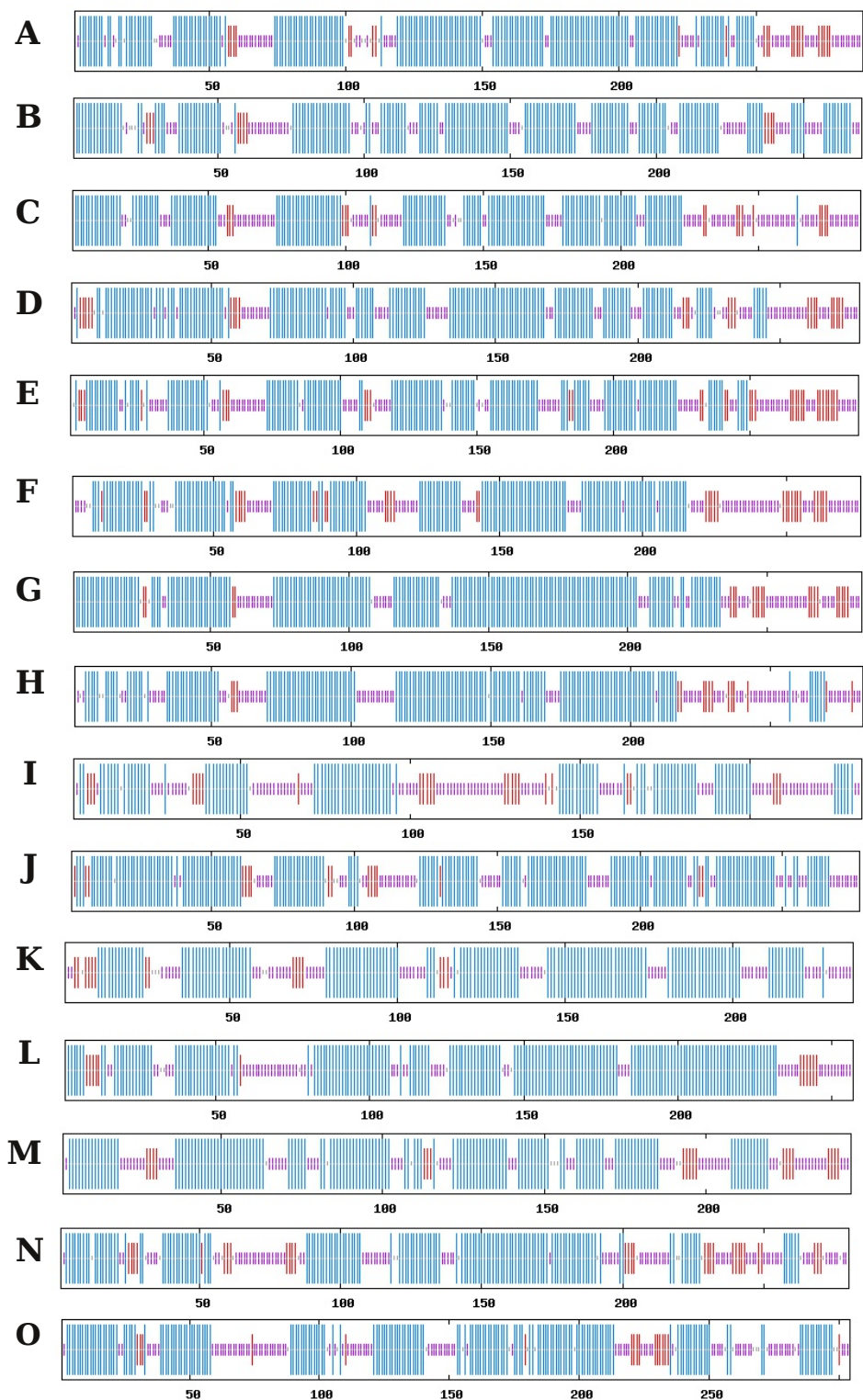
KR = 40

L1: Loop length

EXTRACELLULAR

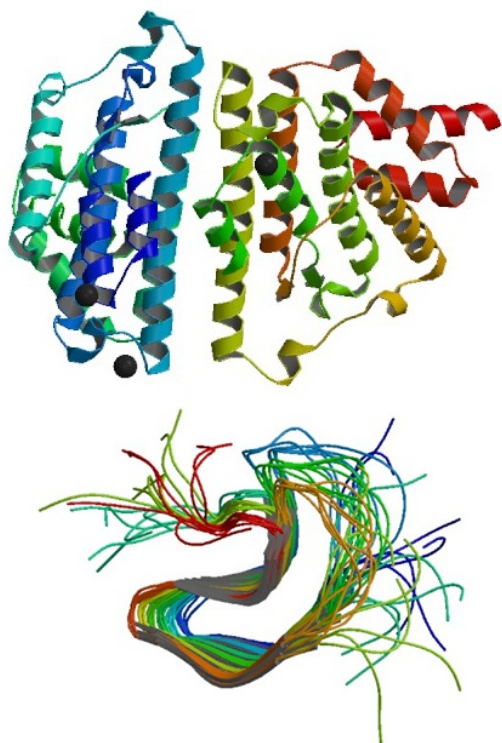
KR: Number of Lys and Arg

Ryc. 13. Wizualizacja fragmentu transbłonowego za pomocą TopPred 0.01.

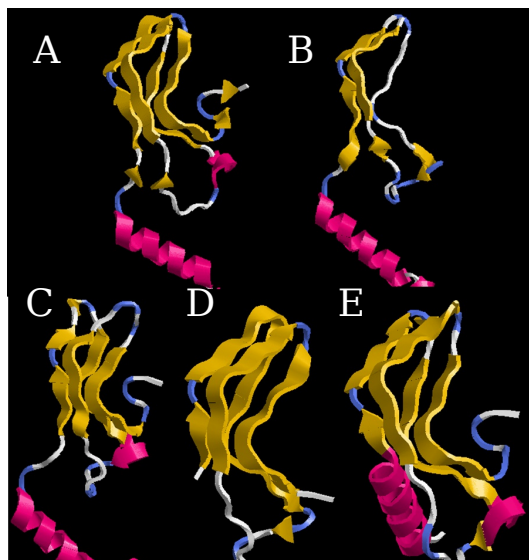


Ryc. 14. Analiza struktury drugorzędowej dokonana za pomocą narzędzia NPSA. (A) *Podospora anserina*, (B) *Fusarium oxysporum*, (C) *Fusarium pseudograminearum*, (D) *Nectria haematococca*, (E) *Trichoderma atroviride*, (F) *Arthroderma otae*, (G) *Grosmannia clavigera*, (H) *Dothistroma septosporium*, (I) *Trichophyton verrucosum*, (J) *Gibberella zeae*, (K) *Neurospora crassa*, (L) *Penicillium chrysogenum*, (M) *Talaromyces stipitatus*, (N) *Magnaporthe oryzae*, (O) *Botryotinia fuckeliana*.

Analiza struktury trzeciorzędowej dokonana została za pomocą silnika ESyPred3D dla domen prionowych jedynie pięciu białek, gdyż reszta odbiegała od modelu wzorcowego, w każdym modelu kolory pokazują nam rodzaj struktury drugorzędowej. Struktury globularne białka analizowano na silniku RaptorX. Wykazują one stosunkowo duże podobieństwo do homologu *Podospory* w przypadku obu domen (dimeru 2WVO oraz agregatu 2KJ3) pokazanych poniżej oraz stworzone na ich podstawie pogrupowane kolorowymi fragmentami modele wzorcowe znajdujące miejsce jako pierwsze z prezentowanych na kolejnych stronach modeli.



Ryc. 15. Zaczepnięte z bazy PDB modele obu domen białka Het-s wraz z przylegającymi do nich identycznymi strukturami.



Ryc. 16. Stworzone na podstawie 2KJ3 modele domen prionopodobnych kolejno dla: (A) *Podospora anserina*, (B) *Fusarium oxysporum*, (C) *Fusarium pseudograminearum*, (D) *Nectria haematococca*, (E) *Trichoderma atroviride*.

Dyskusja i podsumowanie

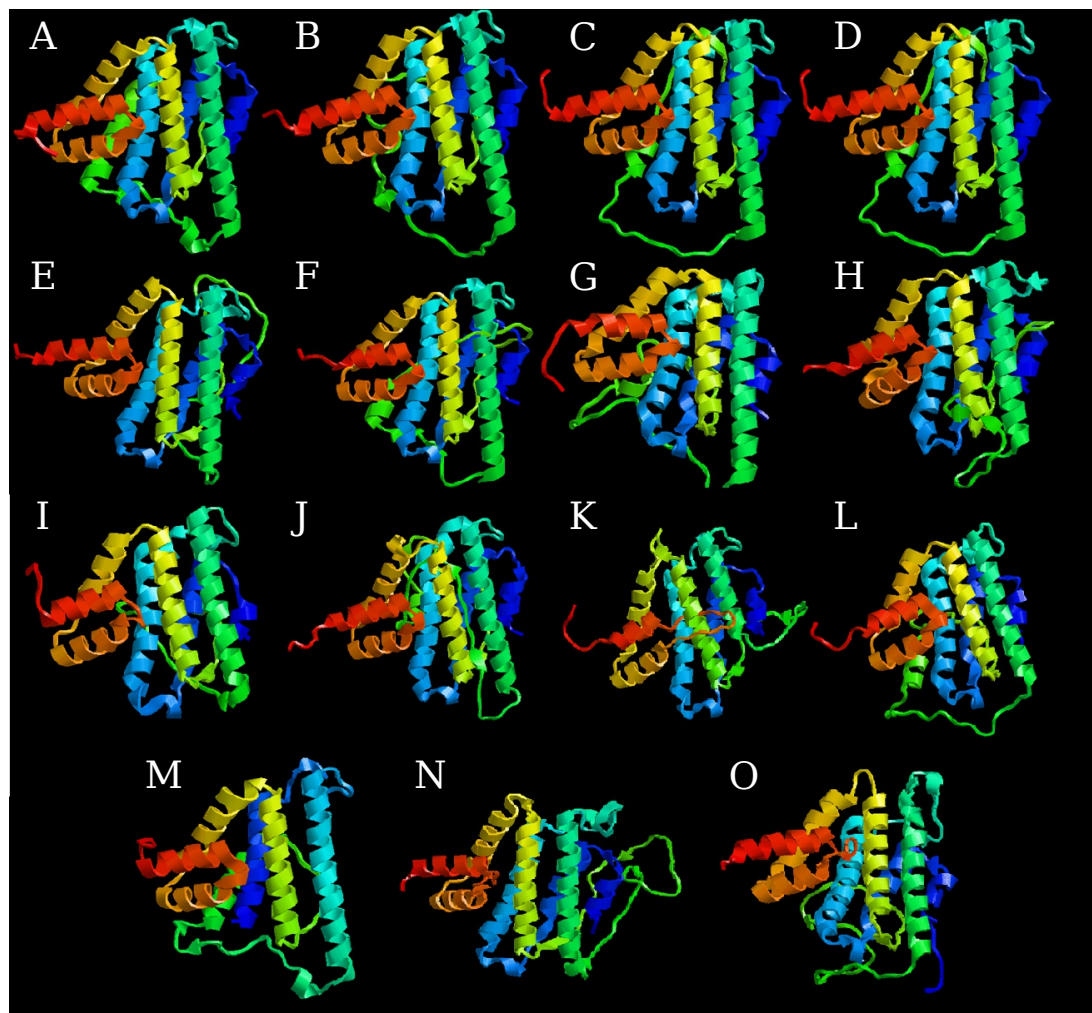
Z danych literaturowych wynika, że badane przeze mnie białko Het-s potrafi w swojej domenie prionowej przyjmować konformację sztywną kumulując się przy tym jako prion oraz inhibując toksyczność przyłączonej doń domeny globularnej.

Analizy miały za zadanie potwierdzić identyczność Het-s u gatunku *Podospora anserina* do jego homologów występujących w innych organizmach. Podobieństwo w wielu przypadkach jest dobrze widoczne nie tylko w składzie sekwencji białka, ale także w jego strukturze przestrzennej, co można dokładnie zaobserwować na prezentowanych modelach przyrównań struktur 3D nieodbiegających swoją budową w znacznym stopniu od pierwotowzoru. Homologi domeny prionowej

wykazywały się dużą zmiennością, jednakże u kilku gatunków dało się zaobserwować wyraźne podobieństwo. Domena globularna dzięki mniejszej zmienności oraz poprzez swoją wielkość została lepiej odczytana przez większość algorytmów a zmienność struktury przestrzennej, chociaż jest widoczna, nie jest na tyle duża, aby nie uznać stwierdzenie, że białka są homo-

logami Het-s.

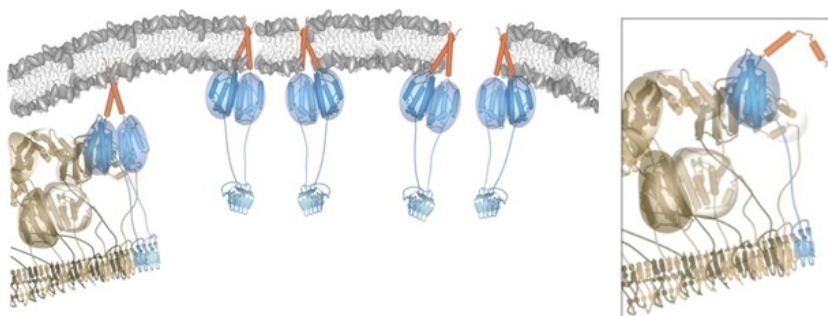
Analiza hydrofobowa wykazała występowanie w domenie globularnej fragmentu (<30 aa) mogącego chętnie zakotwiczyć się w błonie komórkowej co potwierdza badania, które mówią o toksyczności białka i jego destrukcyjnym wpływie na błony pęcherzyków lizosomalnych [19].



Ryc. 17. Stworzone na podstawie 2WVO modele domen globularnych kolejno dla: (A) *Podospora anserina*, (B) *Fusarium oxysporum*, (C) *Fusarium pseudograminearum*, (D) *Nectria haematococca*, (E) *Trichoderma atroviride*, (F) *Arthroderma otae*, (G) *Grosmannia clavigera*, (H) *Dothistroma septosporum*, (I) *Trichophyton verrucosum*, (J) *Gibberella zeae*, (K) *Neurospora crassa*, (L) *Penicillium chrysogenum*, (M) *Talaromyces stipitatus*, (N) *Magnaporthe oryzae*, (O) *Botryotinia fuckeliana*.



Ryc. 18. Molekularny mechanizm aktywacji toksyczności domeny globularnej [Greenwald J, Buhtz C, Ritter C, Kwiatkowski W, Choe S, Maddelein ML, Ness F, Cescau S, Soragni A, Leitz D, Saupe SJ, Riek R. (2010)].



Ryc. 19. Prezentacja fragmentu odpowiadającego za penetrację błony [Seuring C, Greenwald J, Wasmer C, Wepf R, Saupe SJ, Meier BH, Riek R. (2012)].

Bibliografia

- [1] Debets AJ, Dalstra HJ, Slakhorst M, Koopmanschap B, Hoekstra RF, Saupe SJ.(2012), "High natural prevalence of a fungal prion", *Proc Natl Acad Sci U S A*. Jun 26;109(26):10432-7.
- [2] *Podospora anserina* Genome Project, <http://podospora.igmors.u-psud.fr/> , dostęp z dn. 03.09.2013
- [3] Wickner RB., Edskes HK., Shewmaker F., Nakayashiki T. (2007), "Prions of fungi: inherited structures and biological roles", *Nat Rev Microbiol*. Aug;5(8):611-8.
- [4] Coustou V, Deleu C., Saupe S., Begueret J. (1997), "The protein product of the het-s heterokaryon incompatibility gene of the fungus *Podospora anserina* behaves as a prion analog", *Proc Natl Acad Sci USA* 94 (18): 9773-8
- [5] Greenwald J., Buhtz C., Ritter C., Kwiatkowski W., Choe S., Maddelein ML., Ness F., Cescau S., Soragni A., Leitz D., Saupe SJ., Riek R. (2010), "The mechanism of prion inhibition by HET-S". *Molecular Cell* 38 (6): 889-99.
- [6] Maddelein ML., Dos Reis S., Duvezin-Caubet S., Couлары-Salin B., Saupe SJ. (2002), "Amyloid aggregates of the HET-s prion protein are infectious", *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 (11):

7402-7.

- [7] Fowler DM., Kelly JW. (2012), "Functional amyloidogenesis and cytotoxicity-insights into biology and pathology", *PLoS Biol.*;10(12):e1001459.
- [8] Saupe SJ., Daskalov A. (2012), "The [Het-s] prion, an amyloid fold as a cell death activation trigger", *PLoS Pathog.*;8(5):e1002687.
- [9] Altschul, Stephen; Gish, Warren; Miller, Webb; Myers, Eugene; Lipman, David (1990). "Basic local alignment search tool", *Journal of Molecular Biology* 215 (3): 403-410.
- [10] Multiple Sequence Alignment , <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/> , dostęp z dn. 03.09.2013
- [11] Baxevanis A.D., Ouellette B.F.F. (2004), "Bioinformatyka podręcznik do analizy genów i białek", PWN, Właściwości fizyczne oparte na sekwencji:274-5.
- [12] ProtScale, <http://web.expasy.org/prot-scale/> , dostęp z dn. 03.09.2013
- [13] Dor O., Zhou Y. (2006). "Achieving 80% ten-fold cross-validated accuracy for secondary structure prediction by large-scale training". *Proteins* 66
- [14] Zhang Y. (2008). "Progress and challenges

in protein structure prediction". *Curr Opin Struct Biol* 18 (3): 342-8.

[15] Lambert C., Léonard N., De Bolle X., Depiereux E. (2002), "ESyPred3D: Prediction of proteins 3D structures", *Bioinformatics*. Sep;18(9):1250-6.

[16] ESyPred3D Web Server 1.0, <http://webapps.fundp.ac.be/esypred/> , dostęp z dn. 03.09.2013

[17] RaptorX structure prediction, <http://raptorx.uchicago.edu/about/> , dostęp z dn. 03.09.2013

[18] Källberg M., Wang H., Wang S., Peng J., Wang Z., Lu H., Xu J. (2012), "Template-based protein structure modeling using the RaptorX web server", *Nat Protoc.* 2012 Jul 19;7(8):1511-22.

[19] Seuring C., Greenwald J., Wasmer C., Wepf R., Saupe SJ., Meier BH., Riek R.(2012), "The mechanism of toxicity in HET-S/HET-s prion incompatibility", *PLoS Biol.*;10(12):e1001451.

Ryciny

1 - <http://philippejordan.files.wordpress.com/2009/11/podospora-anserina.jpg>, http://podospora.igmors.u-psud.fr/images-web/podospora_photo.jpg , dostęp z dn. 01.09.2017

2 - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2376760/bin/nihms47152f1.jpg> , dostęp z dn. 01.09.2017

3 - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3531510/bin/pbio.1001459.g002.jpg>, dostęp z dn. 01.09.2017

4 - http://www.ncbi.nlm.nih.gov/core/lw/-2.0/html/tileshop_pmc/tileshop_pmc_inline.html?title=Click%20on%20image%20to%20zoom&p=PMC3&id=3359984_pat.100-2687.g001.jpg , dostęp z dn. 01.09.2017

5 - http://people.mbi.ucla.edu/yeates/153AH_2009_project/mendoza_fig2.png, dostęp z dn. 01.09.2017

6 - <http://origin-ars.els-cdn.com/content/image/1-s2.0-S0969212610003084-gr3.jpg>, dostęp z dn. 01.09.2017

8 - <http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=2WVN>, dostęp z dn. 01.09.2017

9 - <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins> , dostęp z dn. 01.09.2017

10,11 - Własny projekt

12 - <http://web.expasy.org/protscale/> , dostęp z dn. 01.09.2017

13 - <http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/interfa->

<ces/toppred.html> , dostęp z dn. 01.09.2017

14 - http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=NPSA/ , dostęp z dn. 01.09.2017

15 - <http://www.rcsb.org/pdb/results/results.do?grid=FA785037&tabtoShow=Current> , dostęp z dn. 01.09.2017

16,17 - Wizualizacja utworzonych modeli za pomocą programu RasTop

18- http://www.ncbi.nlm.nih.gov/core/lw/2.0/html/tileshop_pmc/tileshop_pmc_inline.html?title=Click%20on%20image%20to%20zoom&p=PMC3&id=3507513_nihms382772f6.jpg , dostęp z dn. 01.09.2017

19 - http://www.ncbi.nlm.nih.gov/core/lw/2.0/html/tileshop_pmc/tileshop_pmc_inline.html?title=Click%20on%20image%20to%20zoom&p=PMC3&id=3531502_bio.1001451.g007.jpg , dostęp z dn. 01.09.2017

Tabele

Tab. 1-4 - Opracowane przeze mnie dane z analizy fizykochemicznej białka.